

DERWENT- 1998-510392

ACC-NO:

DERWENT- 199844

WEEK:

*COPYRIGHT 2005 DERWENT INFORMATION LTD*

TITLE: Optical testing method e.g. for diagnosis of liver cancer -  
involves irradiating biological sample sealed using  
glycerol solution containing predetermined amount of water  
and measuring optical echo

PATENT-ASSIGNEE: NIKON CORP[NIKR]

PRIORITY-DATA: 1997JP-0036922 (February 6, 1997)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
JP 10221335 A	August 21, 1998	N/A	004	G01N 033/48

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DESCRIPTOR	APPL-NO	APPL-DATE
JP 10221335A	N/A	1997JP-0036922	February 6, 1997

INT-CL (IPC): G01N001/30, G01N021/64 , G01N021/78 , G01N033/48

ABSTRACTED-PUB-NO: JP 10221335A

BASIC-ABSTRACT:

The method involves staining a biological sample and sealing it with a glycerol solution containing 20-55 wt% of water. Light is radiated towards the stained sample which generates optical echo. The optical echo is detected and measured for performing diagnosis.

ADVANTAGE - Gives exact pathological information of biological sample.

CHOSEN- Dwg.3/3

**DRAWING:**

**TITLE-** OPTICAL TEST METHOD DIAGNOSE LIVER CANCER IRRADIATE  
**TERMS:** BIOLOGICAL SAMPLE SEAL GLYCEROL SOLUTION CONTAIN  
PREDETERMINED AMOUNT WATER MEASURE OPTICAL ECHO

**DERWENT-CLASS:** B04 S03

**CPI-CODES:** B10-E04C; B11-C07B5; B12-K04A1;

**EPI-CODES:** S03-E04D; S03-E04E; S03-E13D; S03-E14H;

**SECONDARY-ACC-NO:**

**CPI Secondary Accession Numbers:** C1998-153956

**Non-CPI Secondary Accession Numbers:** N1998-398125

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-221335

(43) 公開日 平成10年(1998) 8月21日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

F I

G 0 1 N 33/48

G 0 1 N 33/48

P

21/64

21/64

B

21/78

21/78

C

// G 0 1 N 1/30

1/30

審査請求 未請求 請求項の数 2 F D (全 4 頁)

(21) 出願番号

特願平9-36922

(22) 出願日

平成9年(1997) 2月6日

(71) 出願人 000004112

株式会社ニコン

東京都千代田区丸の内3丁目2番3号

(72) 発明者 内川 清

東京都千代田区丸の内3丁目2番3号株式  
会社ニコン内

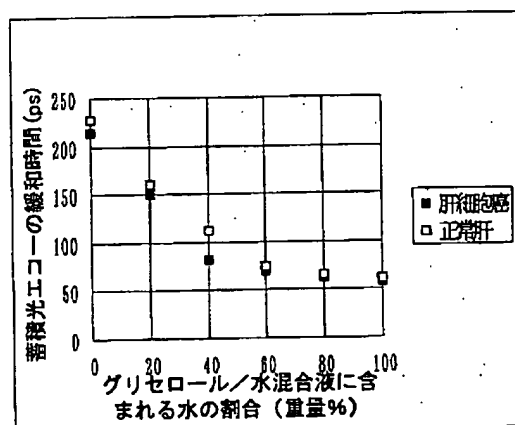
(74) 代理人 弁理士 渡部 温

(54) 【発明の名称】 生物試料の光学的検査方法

(57) 【要約】

【課題】 蓄積光エコー分光によって組織の病理学的情報を得る方法において、染色後のサンプルを封入するグリセロール溶液における適正な水の添加量の範囲を示すことにより、正確な情報を得ることのできる検査方法を提供する。

【解決手段】 本発明の光学的検査方法は、染色された生物試料（細胞試料、組織試料等）に対して励起光を照射した際に該試料から発生する蓄積光エコーを検出して、該試料の生物学的あるいは病理学的情報を得る検査方法である。検査の際に、染色された生物試料を20重量%から55重量%の水を含有するグリセロール溶液で封入した状態で蓄積光エコーを計測することを特徴とする。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 染色された生物試料（細胞試料、組織試料等）に対して励起光を照射した際に該試料から発生する蓄積光エコーを検出して、該試料の生物学的あるいは病理学的情報を得る生物試料の光学的検査方法において、染色された生物試料を20重量%から55重量%の水を含有するグリセロール溶液で封入した状態で蓄積光エコーを計測することを特徴とする生物試料の光学的検査方法。

【請求項2】 上記水に代えて、あるいは水とともに、燐酸ナトリウム緩衝液若しくはその同等物を用いることを特徴とする請求項1記載の生物試料の光学的検査方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、染色された生物試料の光学的応答を測定することによって、試料の生物学的な情報を得ることができる光学的検査方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】染色された生体組織試料に対する蓄積光エコー分光を、組織の病理学的診断に応用する研究が進められている。初期の研究においては、ローダミン系色素で染色された後の試料は、水洗され、室温で乾燥された後、疎水性樹脂により封入された後に蓄積光エコー計測に供されていた（A. Frusawaら、J. Opt. Soc. Am. B 11, 1456(1994)、K. Uchikawaら、Laser Phys. 5, 687(1995)）。

【0003】この方法で作成された組織試料に対して蓄積光エコー測定を行う場合、第一に乾燥過程において組織形状が著しく変形すること、第二に実験結果の再現性が低いこと、第三にサンプル冷却時における封入樹脂の白濁が起こること、等が測定上の障害となっていた。これらの問題は、染色後の組織試料を水を添加したグリセロール溶液で封入することによってある程度軽減されることが最近示された（K. Uchikawaら、J. Opt. Soc. Am. B, in press）。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、水を添加したグリセロール溶液で組織試料を封入した場合、グリセロール溶液における水の添加量によって測定値が著しく変化することが判明した。また、水の添加量は試料冷却時における試料の白濁の問題とも深く関係している。本発明は、蓄積光エコー分光によって組織の病理学的情報を得る方法において、染色後のサンプルを封入するグリセロール溶液における適正な水の添加量の範囲を示すことにより、正確な病理学的情報を得ることのできる検査方法を提供することを目的とする。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】上記課題を解決するため、本発明の光学的検査方法は、染色された生物試料

（細胞試料、組織試料等）に対して励起光を照射した際に該試料から発生する蓄積光エコーを検出して、該試料の生物学的あるいは病理学的情報を得る生物試料の光学的検査方法において、染色された生物試料を20重量%から55重量%の水を含有するグリセロール溶液で封入した状態で蓄積光エコーを計測することを特徴とする。

【0006】本発明においては、上記水に代えて、あるいは水とともに、燐酸ナトリウム緩衝液若しくはその同等物を用いることもできる。ここで、燐酸ナトリウム緩衝液の同等物とは、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、及び $\text{NaCl}$ が適量蒸留水に混合され、所望のpH、塩濃度を示す溶液のことを指す。その例としては、2.9gの $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.3gの $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、8.5gの $\text{NaCl}$ を1リットルの蒸留水に溶解した溶液を挙げることができる。

## 【0007】

【発明の実施の形態】組織試料の染色までの処理は、試料の保存形態により異なる。パラフィン包埋保存されている組織試料に対しては、まずパラフィンをキシレンで落とした後、アルコール、次に水で洗浄し、ローダミン水溶液に浸し染色を行う。凍結保存サンプルの場合は、薄片化してガラス基板に載せた後、水洗し、ローダミン水溶液で染色する。培養細胞や摂取細胞（スメア）なども、ガラス基板の上に固定した後、ローダミン水溶液で染色する。染色後のサンプルはすべて十分水洗し、その後、本発明のグリセロール／水混合液で封入する。

【0008】封入に用いるグリセロール／水混合液の作成は、室温において、所定の量のグリセロールと水を混合することによって行うことができる。実際の封入過程では、染色、洗浄後のサンプルはグリセロール／水混合液に浸され、十分その混合液に馴染んだ後、直ちにカバーガラスで覆われた。室温において、グリセロール／水混合液は液体状態にあるので、測定の前に適当な器具を用いて固定する必要がある。固定器具の一例を図3に示す。図中で、符号5は試料を固定したスライドガラスである。4は封入剤（混合液）である。3はカバーガラスである。1、6は、ガラスを挟む金具である。2は、金具1、6を連結するネジである。7は、固定器具を取り扱うための支持棒である。

## 【0009】

【実施例】肝臓の組織サンプルを本発明の1実施例に係る方法で測定した例について、図2を参照しつつ以下に説明する。肝細胞癌組織、及び正常肝組織を、それぞれ異なる患者の体内から摘出した（101）。このサンプル組織を、ホルマリン固定及びアルコール固定（102）を経て、パラフィン包埋し（103）、室温で保存した（104）。次にこれらのサンプルを、マイクロームによって、大きさ約2×2cm、厚さ約5～10ミク

ロンにスライスし(105)、顕微鏡のスライドガラス上に固定した(106)。それぞれのサンプルのうちで数枚はヘマトキシリン-エオシン染色し(107)を行い、顕微鏡観察による病理診断(108)に用いた。

【0010】他のサンプルは蓄積光エコー計測を行うために、ローダミン色素で染色した。染色方法は以下のとおりである。まず、始めにサンプルを覆っていたパラフィンをキシレンで洗浄し、アルコール洗浄、水洗(110)を経て、ローダミン色素水溶液に浸した(111)。ローダミン色素として、XRITC (rhodamine-x-isothiocyanate)を用いた。XRITCは蛋白の2級アミンと結合する官能基を有する。染色に用いた色素溶液の濃度は約 $10^{-4}$ ~ $10^{-5}$  mol/lであった。染色は温度約15℃の染色液に90秒から120秒試料を浸して行った。サンプルの光学濃度は波長600nmにおいて0.1以下であった。

【0011】染色後のサンプルは、5分以上流水洗浄し(112)、余分の色素を除いた。次に、サンプルを35重量%の水を含むグリセロール/水混合液に数分間浸し(113)、続いて、グリセロール/水混合液に覆われたままの状態ですファイヤで作られたカバーガラスを載せ、サンプルホルダーに固定した(114)。サンプルをヘリウムクライオスタットを用いて、室温から10kまで約10分冷却し、さらにサンプルの温度分布が均一になるよう6.5k以下で1時間以上保持した。

【0012】その後、両方のサンプルの蓄積光エコーの緩和時間計測を行った。測定温度は6.3k、励起光として、ローダミン6Gレーザから発生するインコヒーレントレーザを用いた。計測装置の構成は、前記文献に示した装置と同様とした。肝細胞癌と正常肝組織において、異なる蓄積光エコーの緩和時間が測定された。多数回の測定(内容後述)の後、両者における蓄積光エコーの緩和時間の平均は、癌において正常より約30%短いことが明らかになった。

【0013】次に、グリセロール/水混合液中の水の割合を0~100%の範囲で変化させて蓄積光エコー計測した実験について説明する。フォルマリン固定の後、パラフィン包埋された肝細胞癌組織と正常肝組織を、上記の処理によりrhodamine-x-isothiocyanateで染色した後、ローダミン6Gインコヒーレントレーザを用いて

蓄積光エコーの緩和時間を測定した。測定結果を図1に示す。図において、横軸は水の割合(重量%)を、縦軸は蓄積光エコーの緩和時間を示す。測定は6.3kで行った。図1から、癌、及び正常組織における蓄積光エコーの緩和時間が、封入に用いられたグリセロール/水混合液における水の添加量に強く依存することがわかる。また、癌と正常組織における蓄積光エコーの緩和時間の差については、封入に用いられたグリセロール/水混合液における水の添加量が20重量%から55重量%で有意な差(肝細胞癌の方が短い)として観測された。なお、グリセロールに添加する水を、pH7.0~7.4に調整された燐酸ナトリウム緩衝液で代用した場合も同様の結果が得られた。

【0014】このように、本実施例では、ローダミン色素で染色された癌、及び正常組織試料を20重量%から55重量%の範囲の水を含有するグリセロール溶液で封入し、蓄積光エコーを計測することにより、癌と正常組織を観測された蓄積光エコーの緩和時間から区別することができた。

20 【0015】

【発明の効果】以上の説明から明らかなように、本発明は、蓄積光エコー分光によって組織の病理学的情報を得る方法において、染色後のサンプルを封入するグリセロール溶液における適正な水の添加量の範囲を示すことにより、正確な病理学的情報を得ることのできる検査方法を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】肝細胞癌及び正常肝組織における、蓄積光エコーの緩和時間と封入に用いたグリセロール/水混合液の含水率の関係を示すグラフである。

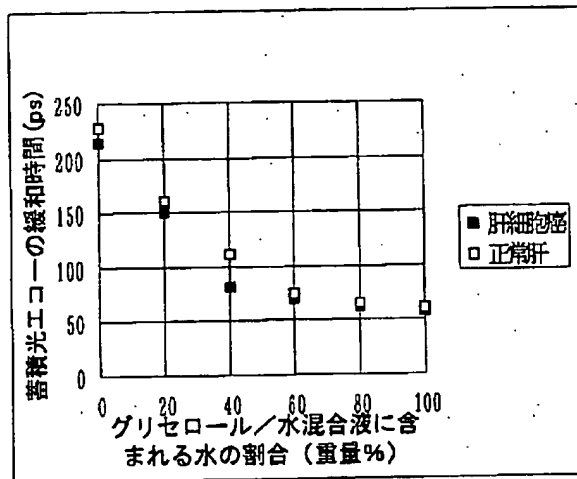
30 【図2】蓄積光エコーの緩和時間計測法による人間の肝組織における癌組織の検査方法のフローを示す図である。

【図3】試料を固定したスライドガラスと混合液の固定器具の一例を示す平面図及び側面図である。

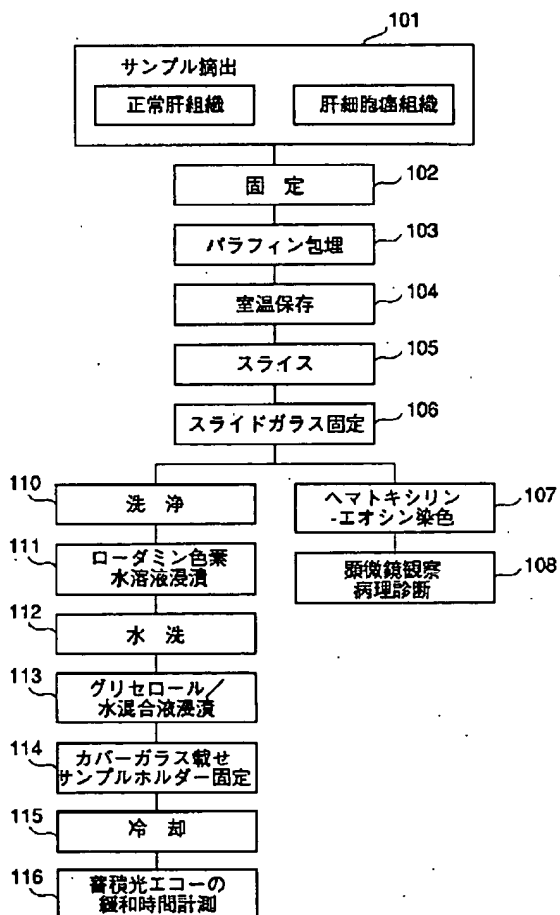
【符号の説明】

- |                 |       |
|-----------------|-------|
| 1 金具            | 2 ネジ  |
| 3 カバーガラス        | 4 封入剤 |
| 5 スライドガラス(サンプル) | 6 金具  |
| 40 7 支持棒        |       |

【図1】



【図2】



【図3】

